

УДК 51-76:577.322:539.19

*И. А. КАШИН¹, член-корреспондент А. В. ТУЗИКОВ², А. М. АНДРИАНОВ¹***МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА СТРУКТУРНОГО КОМПЛЕКСА БЕЛКА GP41 ВИЧ-1
С МОНОКЛОНАЛЬНЫМ АНТИТЕЛОМ 10E8,
ПРОЯВЛЯЮЩИМ ШИРОКУЮ ВИРУСНУЮ НЕЙТРАЛИЗАЦИЮ**¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск²Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси, Минск

Поступило 15.12.2014

Введение. ВИЧ-1 проникает в клетку хозяина путем последовательного взаимодействия белка gp120 оболочки вируса с первичным рецептором CD4 и хемокиновыми корецепторами CCR5 или CXCR4 [1–3]. В результате этих взаимодействий происходят структурные изменения gp120, которые активируют трансмембранный белок gp41, что приводит к слиянию вирусной и клеточной мембран и последующему внедрению генома ВИЧ в клетку-мишень [1–3].

Антитела к ВИЧ-1 способны заблокировать участки, активированные при связывании gp120 с мембраной чувствительной клетки. При этом у большинства пациентов образуются типоспецифические антитела, распознающие штамм, циркулирующий в их организме, но слабо нейтрализующие модификации ВИЧ-1, выделенные от других пациентов. Однако в последние годы зарегистрированы случаи выработки широкого спектра перекрестно реагирующих нейтрализующих антител, включающего антитела к консервативным участкам связывания gp120 с рецептором CD4 и корецепторами, а также к важному для слияния вируса с мембраной клетки-мишени участку MPER (membrane-proximal external region) белка gp41 [4–7].

Обнаружение антител с широким спектром нейтрализующей активности является важным шагом к разработке вакцины против ВИЧ-1. Тем не менее, уникальные свойства вируса, такие как экстраординарная изменчивость, способность избегать реакций системы приобретенного иммунитета, неспособность вызывать выработку разных антител, раннее наступление латентной фазы в его жизненном цикле и отсутствие здоровой иммунной системы, создают беспрецедентные препятствия на этом пути [4; 5]. В связи с этим представляется актуальным поиск низкомолекулярных соединений, способных имитировать фармакофорные свойства антигенсвязывающих центров антител с широкой вирусной нейтрализацией. При этом аминокислотные остатки антител, вносящие определяющий вклад в их специфические взаимодействия с белками оболочки ВИЧ, могут быть использованы в качестве модели фармакофора для разработки новых эффективных анти-ВИЧ агентов. Однако и в этом случае решение проблемы сопряжено с определенными трудностями. Известно [8], что лекарственные препараты пептидной природы обладают рядом недостатков, таких как быстрая деградация в физиологических условиях в результате воздействия специфических и неспецифических пептидаз, конформационная гибкость, позволяющая пептидам связываться с различными рецепторами, что приводит к нежелательным побочным эффектам, а также плохое всасывание и затрудненная транспортировка из-за большой молекулярной массы. Для обхода перечисленных проблем часто прибегают к замене природных пептидов пептидомиметиками – соединениями, способными взаимодействовать с той же мишенью, но содержащими непептидные элементы структуры [8]. Один из таких подходов предполагает скрининг баз данных химических соединений, использующий в качестве набора входных данных аминокислотные остатки потенциального лекарства, критические для его взаимодействия с молекулой-мишенью [9].

Конструирование лекарственных препаратов прошло сложный и долгий путь, но до последних лет методы их поиска оставались неизменными: от выделения вещества из природных источников или от сложнейшего многостадийного синтеза к тестированию на биологическую активность. Однако этот процесс недостаточно эффективен, так как для выявления нужного вещества приходится исследовать «вручную» тысячи химических соединений. В последнее десятилетие постоянно возрастающую роль в этом процессе играют методы компьютерного молекулярного моделирования, которые позволяют значительно сократить сроки разработки новых лекарств и существенно уменьшить финансовые расходы. В настоящей работе методами молекулярной динамики исследованы конформационные и энергетические характеристики структурного комплекса белка gp41 ВИЧ-1 с моноклональным антителом (АТ) 10Е8, проявляющим широкую (98 %) вирусную нейтрализацию путем специфического связывания с консервативным спиральным доменом МРЕР gp41 [10]. Выполнен анализ интерфейса динамических структур комплекса, направленный на выявление остатков АТ 10Е8 и белка gp41, критических для образования надмолекулярной структуры.

Для решения этой задачи выполнены следующие исследования:

1) осуществлены молекулярно-динамические (МД) расчеты структурного комплекса участка МРЕР белка gp41 с Fab-фрагментом АТ 10Е8, установленного методом рентгеноструктурного анализа [10];

2) проведена количественная оценка вариабельности атомных координат комплекса в процессе МД моделирования;

3) идентифицированы межмолекулярные водородные связи и рассчитаны частоты их появления на МД траектории;

4) рассчитана энтальпия связывания белка gp41 с АТ 10Е8 и определены вклады их аминокислотных остатков в энергетическую стабилизацию комплекса.

В результате проведенных исследований обнаружены остатки АТ 10Е8 и белка gp41, ответственные за специфическое связывание, и установлены межмолекулярные взаимодействия, детерминирующие механизм «узнавания» антителом участка МРЕР ВИЧ-1. Полученные данные о критических взаимодействиях в динамических структурах комплекса gp41/10Е8 могут быть использованы для виртуального скрининга потенциальных пептидомиметиков АТ 10Е8 и оценки их эффективности методами молекулярного моделирования с последующим отбором химических соединений, подлежащих тестированию на анти-ВИЧ активность к широкому набору вариантов вируса.

Материалы и методы исследования. Структурный комплекс участка МРЕР белка gp41 ВИЧ-1 с Fab-фрагментом АТ 10Е8, установленный методом рентгеновской кристаллографии [10], заимствовали из базы Международного банка белков (код 4G6F; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Начальные координаты атомов водорода определяли с привлечением модуля tleap пакета AmberTools 1.5 (<http://ambermd.org/>) [11]. МД расчеты проводили с помощью программного пакета Amber 11 (<http://ambermd.org/>) в силовом поле Amber (набор параметров ff10) с явным заданием растворителя (трехточечная модель воды ТРЗР) [11]. Структурный комплекс помещали в ячейку в форме усеченного октаэдра таким образом, чтобы наименьшее расстояние между ее гранями и атомами исследуемой системы превосходило 10 Å, после чего свободное пространство заполняли молекулами воды. Перед проведением МД расчетов энергию структурного комплекса минимизировали методами наискорейшего спуска (500 шагов) и сопряженных градиентов (1000 шагов). Затем осуществляли нагрев системы от 0 до 310 К в течение 1,4 нс при постоянном объеме ячейки. На следующем шаге в течение 1 нс уравнивали давление в системе, установленное на значении 1 атм, посредством динамического изменения размеров ячейки согласно схеме Берендсена и соавт. (<http://ambermd.org/>) [12] с характерной частотой $2,0 \text{ пс}^{-1}$. На этапах нагрева и уравнивания давления накладывали дополнительные ограничения на положения атомов системы с помощью потенциала параболической формы с силовыми постоянными, равными соответственно 1,0 и 0,5 ккал/моль. Далее эти ограничения снимали и вновь подвергали систему релаксации в течение 1 нс. На заключительном шаге моделирования проводили расчет МД траектории длительностью 60 нс в изобарно-изотермических условиях ($T = 310 \text{ К}$, $P = 1,0 \text{ атм}$). Для контроля

температуры использовали термостат Ланжевена (<http://ambermd.org/doc10/>) [11] с частотой столкновений $2,0 \text{ пс}^{-1}$. Контроль давления в ячейке осуществляли с помощью баростата Берендсена [11] с характерным временем $1,0 \text{ пс}$. Интегрирование уравнений движения Ньютона выполняли с помощью алгоритма leap-frog (<http://ambermd.org/doc10/>) [11] с шагом интегрирования $2,0 \text{ фс}$. Для расчета энергии электростатических взаимодействий использовали метод суммирования Эвальда. Для фиксации длин всех связей, в образовании которых участвуют атомы водорода, применяли алгоритм SHAKE (<http://ambermd.org/>) [13]. Максимальное расстояние, на котором учитывали невалентные взаимодействия, задавали равным $8,0 \text{ \AA}$.

Для оценки структурной вариабельности комплекса использовали значения среднеквадратичных отклонений (СКО) между координатами атомов основной цепи его динамических структур и стартовой (кристаллографической) модели. Кроме того, для этой цели привлекали средние значения СКО атомных координат, полученные в результате сопоставления динамических структур между собой. Расчеты СКО проводили с помощью программного модуля ptrau пакета AMBERTools (<http://ambermd.org/>) [11]. Этот модуль использовали также для идентификации межмолекулярных водородных связей в динамических структурах комплекса и вычисления частот их встречаемости на МД траектории.

Расчет энтальпии связывания белка gp41 с АТ 10E8 и оценку вкладов их аминокислотных остатков в свободную энергию образования комплекса проводили с помощью процедуры ММ-РВ/SA [14], входящей в состав пакета AMBER 11 [11]. В качестве критерия устойчивости комплекса использовали средние значения энтальпии и соответствующие им стандартные отклонения, которые вычисляли для 2000 «точек» МД траектории, разделенных временным интервалом длительностью 10 пс . Анализ МД траектории выполняли с помощью программного пакета AmberTools 1.5 [11].

Расчеты проводили на компьютерном кластере «СКИФ-ОИПИ» Объединенного института проблем информатики НАН Беларуси [15].

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 показана временная зависимость СКО между координатами атомов динамических структур комплекса gp41/10E8 и его стартовой модели, установленной методом рентгеновской кристаллографии [10]. Как видно из рис. 1, в течение первых 40 нс МД расчетов исследуемый комплекс подвергается структурным перестройкам, однако в последующие 20 нс эта надмолекулярная структура проявляет относительную конформационную стабильность. Этот вывод, сделанный на основе визуального анализа приведенной на рис. 1 зависимости, подтверждают данные о средних значениях СКО атомных координат основной цепи комплекса, вычисленных для его динамических структур и стартовой модели. Так, для первых 40 нс МД траектории средняя величина СКО составляет $2,55 \pm 0,59 \text{ \AA}$, а для заключительных 20 нс – $1,63 \pm 0,26 \text{ \AA}$. Сопоставление динамических структур комплекса между собой

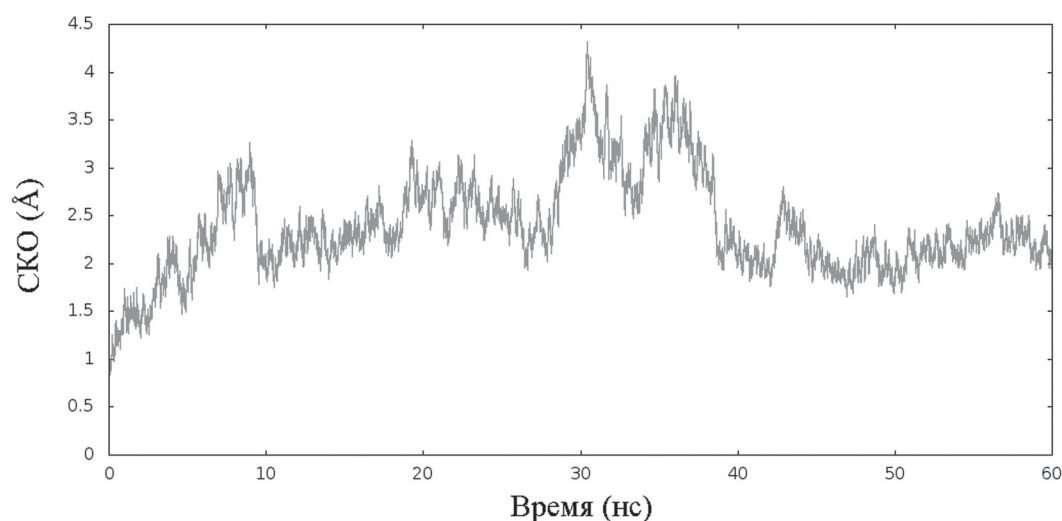


Рис. 1. Временная зависимость СКО между координатами атомов основной цепи динамических структур комплекса gp41/10E8 и его кристаллографической модели

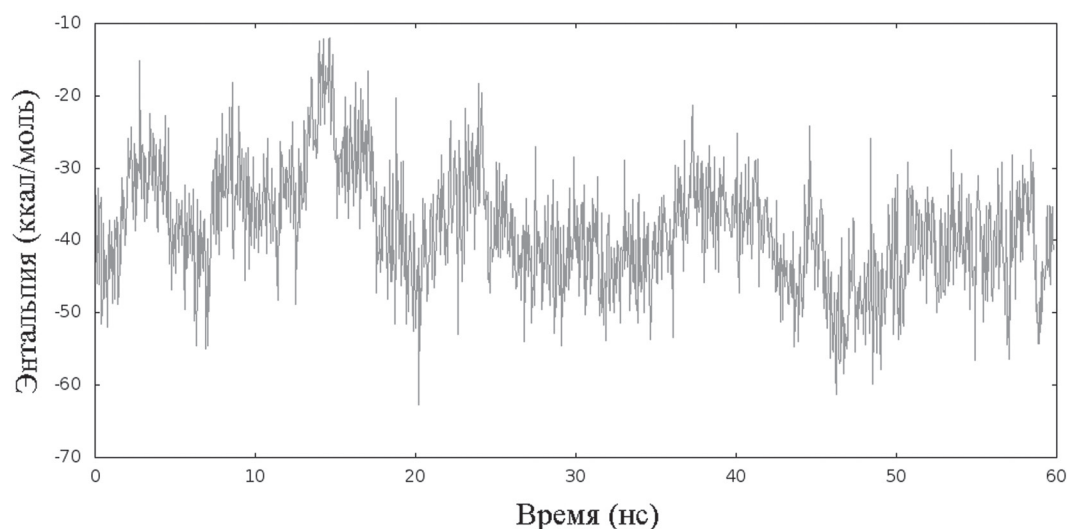


Рис. 2. Временная зависимость энтальпии связывания участка MPER белка gp41 с Fab-фрагментом AT 10E8

также обнаруживает меньшие флуктуации координат его атомов на последних 20 наносекундах МД моделирования: в этом случае средние значения СКО во временных интервалах 1–40 нс и 40–60 нс равны соответственно $2,06 \pm 0,61 \text{ \AA}$ и $1,66 \pm 0,36 \text{ \AA}$. Полученные данные согласуются с приведенной на рис. 2 временной зависимостью энтальпии связывания AT 10E8 с белком gp41, анализ которой показывает, что в последние 20 нс МД структуры комплекса характеризуются более низкими и стабильными значениями энергии по сравнению с предшествующими стадиями МД расчетов. Исходя из этих данных, при расчете энтальпийной составляющей свободной энергии образования комплекса и энергии связывания индивидуальных аминокислотных остатков учитывали завершающие 20 нс МД траектории, тогда как первые 40 нс рассматривали как время, необходимое системе для релаксации. Полученное в результате среднее значение энтальпии связывания составило $-42,44 \pm 6,68 \text{ ккал/моль}$, что указывает на устойчивость комплекса в рассмотренном временном интервале.

В табл. 1 представлены средние значения энтальпии связывания аминокислотных остатков AT 10E8 с белком gp41. Из данных этой таблицы видно, что важная роль в формировании ста-

Т а б л и ц а 1. Средние значения энтальпии связывания аминокислотных остатков AT 10E8 с белком gp41 ВИЧ-1

Аминокислотный остаток AT 10E8*	Энтальпия связывания**, ккал/моль	
	Боковой цепи	Полная
Asn-31 ^H	-0,74	-0,54
Trp-33 ^H	-2,07	-2,03
Pro-52b ^H	-0,49	-0,63
Gly-52c ^H	-0,66	-1,39
Tyr-98 ^H	-1,37	-1,04
Tyr-99 ^H	-6,15	-5,67
Asp-100 ^H	-0,80	-3,86
Phe-100a ^H	-5,07	-6,08
Trp-100b ^H	-3,63	-4,20
Gly-100d ^H	-0,22	-2,51
Pro-100f ^H	-0,43	-1,09
Glu-53 ^L	-1,22	-1,22
Arg-95B ^L	-1,17	-1,25

П р и м е ч а н и я: * – верхние индексы H и L обозначают соответственно аминокислотные остатки тяжелой и легкой цепи AT 10E8; ** – приведены данные для остатков AT 10E8, для которых энергия связывания меньше $-0,5 \text{ ккал/моль}$.

Т а б л и ц а 2. Средние значения энтальпии связывания аминокислотных остатков белка gp41 с АТ 10Е8

Аминокислотный остаток белка gp41	Энтальпия связывания*, ккал/моль	
	Боковой цепи	Полная
Leu-660	–3,04	–3,08
Leu-663	–1,37	–1,31
Asn-671	–0,99	–3,19
Trp-672	–6,12	–7,61
Phe-673	–4,96	–5,03
Thr-676	–1,44	–1,54
Leu-679	–1,64	–2,36
Trp-680	–0,40	–0,50
Arg-683	–5,06	–6,01
Arg-684	–2,54	–2,45

П р и м е ч а н и е. * – Приведены данные для остатков белка gp41, для которых энергия связывания меньше –0,5 ккал/моль.

бильного комплекса АТ 10Е8 с белком gp41 ВИЧ-1 принадлежит тетрапептидному фрагменту Tyr-99–Asp-100–Phe-100a–Trp-100b тяжелой цепи иммуноглобулина, на боковые группы которого приходится большая часть эффективных межмолекулярных взаимодействий. Наряду с этими остатками отметим также Trp-33 и Gly-100d АТ 10Е8, для которых абсолютные значения энергии превышают 2 ккал/моль (табл. 1). Анализ результатов расчета энергии связывания для остатков белка gp41 (табл. 2) позволяет выделить в качестве «горячих точек» Trp-672, Phe-673 и Arg-683, что

согласуется с экспериментальными данными по аламиновому сканированию [10], свидетельствующими о том, что эти консервативные аминокислоты gp41 являются критическими для образования его структурного комплекса с АТ 10Е8.

Анализируя полученные результаты, отметим, что, согласно данным рентгеновской кристаллографии [10], большинство из указанных выше остатков АТ 10Е8 и белка gp41 принимают участие в прямых межмолекулярных контактах, ведущих к формированию стабильной надмолекулярной структуры. Так, в рентгеновской структуре комплекса [10] остатки Phe-100a и Gly-100d АТ 10Е8 образуют водородные связи с Arg-683 белка gp41. При этом остатки Trp-33 и Tyr-99 антитела участвуют в ван-дер-ваальсовых взаимодействиях с Trp-672 gp41, а остаток Trp-100b – с Arg-683. Кроме того, этот тип взаимодействий реализуется между функционально важным остатком Phe-673 АТ 10Е8 и Arg-95b – остатком белка gp41, который, согласно расчетным данным (табл. 1), также вносит вклад в энтальпийную составляющую

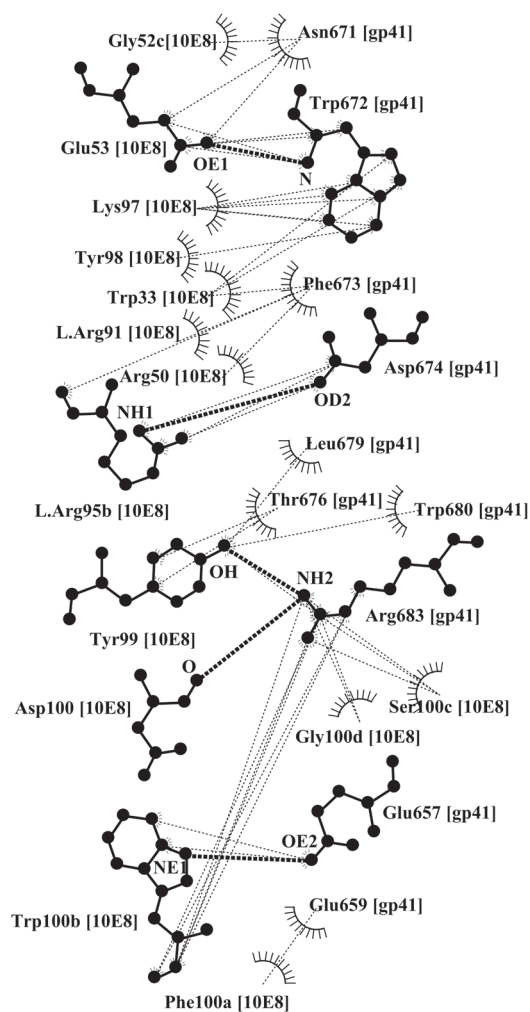


Рис. 3. Схематическое изображение интерфейса динамической структуры комплекса gp41/10Е8, полученное с помощью программы LigPlot (www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/) для последней «точки» МД траектории. Приведены остатки АТ 10Е8 и белка gp41, формирующие межмолекулярные водородные связи и ван-дер-ваальсовы контакты. Водородные связи и ван-дер-ваальсовы контакты показаны соответственно темными и светлыми штриховыми линиями

свободной энергии образования комплекса. Анализ межмолекулярных водородных связей, реализующихся в динамических структурах комплекса, показывает, что, как и в статической (рентгеновской) модели, в их формировании участвуют остатки AT 10E8 и белка gp41, идентифицированные нами как функционально важные для образования стабильной надмолекулярной структуры. Среди этих остатков в первую очередь следует выделить Arg-683 белка gp41 и Asp-100 AT 10E8, образующие две водородные связи, частоты встречаемости которых на МД траектории составляют 83,67 и 22,31 %. Отметим также остаток Trp-672 белка gp41, образующий водородную связь с Glu-53 AT 10E8 в 74,9 % динамических структур исследуемого комплекса. Наряду с водородными связями, в динамических структурах комплекса наблюдается широкая сеть вандер-ваальсовых контактов между функционально важными остатками белка gp41 и AT 10E8. В качестве примера на рис. 3 представлено схематическое изображение интерфейса динамической структуры комплекса, реализующейся в последней «точке» МД траектории. Анализ рис. 3 показывает, что в состав интерфейса входит значительная часть остатков белка gp41 и AT 10E8, характеризующихся, согласно расчетным данным, отрицательными значениями энергии связывания (ср. данные рис. 3 и табл. 1 и 2). При этом Tyr-99 и Asp-100 AT 10E8 образуют водородные связи с функционально критическим остатком Arg-683 белка gp41, а Glu-53 иммуноглобулина участвует в водородном связывании с Trp-672 – остатком gp41, который, как и Arg-683, играет важную роль в энергетической стабилизации комплекса [10].

Заключение. Таким образом, данные МД расчетов структурного комплекса показывают, что наибольший вклад в его формирование вносят остатки Tyr-99, Asp-100, Phe-100a, Trp-100b тяжелой цепи AT 10E8 и Trp-672, Phe-673, Arg-683 белка gp41. Полученные результаты формируют продуктивную основу для виртуального скрининга, компьютерного тестирования и разработки новых ингибиторов проникновения ВИЧ-1 – пептидомиметиков AT 10E8, обладающих широким спектром нейтрализующей активности.

Работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований «Междисциплинарные научные исследования, новые зарождающиеся технологии как основа устойчивого инновационного развития» (ГПНИ «Конвергенция»; задание 3.2.05).

Литература

1. Hartley O., Klasse P. J., Sattentau Q. J., Moore J. P. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2005. Vol. 21. P. 171–189.
2. Sirois S., Sing T., Chou K. C. // *Curr. Prot. Pept. Sci.* 2005. Vol. 6. P. 413–422.
3. Andrianov A. M. // *Expert Opin. Drug Discov.* 2011. Vol. 6. P. 419–435.
4. Hoxie J. A. // *Annu. Rev. Med.* 2010. Vol. 61. P. 135–152.
5. Walker L. M., Burton D. R. // *Curr. Opin. Immunol.* 2010. Vol. 22. P. 358–366.
6. Kwong P. D., Mascola J. R., Nabel G. J. // *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* 2011. Vol. 1. a007278.
7. McCoy L. E., Weiss R. A. // *J. Exp. Med.* 2013. Vol. 210. P. 209–223.
8. Vagner J., Qu H., Hruby V. J. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2008. Vol. 12. P. 292–296.
9. Floris M., Masciocchi J., Fanton M., Moro S. // *Nucl. Acids Res.* 2011. Vol. 39, suppl. 2. P. W261–W269.
10. Huang J., Ofek G., Laub L. et al. // *Nature*. 2012. Vol. 491. P. 406–414.
11. Case D. A., Darden T. A., Cheatham T. E. et al. // *AMBER 11*, University of California, San Francisco. 2010.
12. Berendsen H. J. C., Postma J. P. M., van Gunsteren W. F. et al. // *J. Chem. Phys.* 1984. Vol. 81. P. 3684–3690.
13. Ryckaert J. P., Ciccotti G., Berendsen H. J. C. // *J. Comput. Phys.* 1977. Vol. 23. P. 327–341.
14. Massova I., Kollman P. A. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1999. Vol. 121. P. 8133–8143.
15. Абрамев С. В., Абрамов С. М., Анищенко В. В. и др. Суперкомпьютерные конфигурации СКИФ. Минск, 2005. – 170 с.

I. A. KASHYN, A. V. TUZIKOV, A. M. ANDRIANOV

andrianov@iboch.bas-net.by

MOLECULAR DYNAMICS OF THE STRUCTURAL COMPLEX OF THE HIV-1 GP41 PROTEIN WITH MONOCLONAL ANTIBODY 10E8 EXHIBITING BROAD VIRAL NEUTRALIZATION

Summary

Conformational and energy characteristics of the structural complex between the HIV-1 gp41 protein and monoclonal antibody 10E8 exhibiting broad viral neutralization were studied by molecular dynamics simulations. Contributions of the amino acid residues of the gp41 protein and antibody 10E8 to the enthalpy constituent of the free energy of the complex formation were estimated. Residues Tyr-99, Asp-100, Phe-100a, Trp-100b of the heavy chain of antibody 10E8 and Trp-672, Phe-673, Arg-683 of the gp41 protein were shown to be critical for the binding. The results obtained form a productive basis for virtual screening, computer testing, and development of novel HIV-1 entry inhibitors presenting the antibody 10E8 peptidomimetics with broad-spectrum neutralizing activity.